N° 7

SUR L'ÉTUDE DES NUCLÉOTIDES LIBRES DES HÉMATIES DE RAT

THÈSE

présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille
LE 20 DECEMBRE 1968

par

Martine KREITMANN

née le 15 Novembre 1943, à Marseille

PHARMACIEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse	M. le Professeur J. C. DUMAZERT	Président
	MM. les Professeurs F. PELLISSIER, J. MERCIER, Cl. GHIGLIONE	Assesseurs

IMPRIMERIE LINO-IMP — MARSEILLE

Martine KREITMANN

SUR L'ÉTUDE DES NUCLÉOTIDES LIBRES DES HÉMATIES DE RAT

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Faculté mixte de médecine et de pharmacie de Marseille

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : H. GASTAUT
Doyen honoraire : G. MORIN
Assesseurs : Ch. GREBUS et J. CHARPIN
Attaché Principal, Chef des Services Administratifs : P. MOUCHET.

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. MONGES, ROCHE, CHAUVIN, MATTEI, DE VERNEJOUL, GIRAUD, MERCIER, MARONNEAUD, VIGNOLI.

PROFESSEURS TITULAIRES DE CHAIRES

Anatomie	MM. GRISOLI
Anatomie appliquée et Chirurgie expérimentale	HENRY
Anatomie pathologique	GASTAUT
Bactériologie et virologie	BRAHIC
Biochimie médicale	LISSITZKY
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie Clinique et Expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique et hydrologie	PASTOR
Chimie biologique	DERRIEN
Chimie minérale	MOURGUE
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique Chirurgicale	LAMY
Clinique Chirurgicale	LENA
Clinique Chirurgicale Infantile et orthopédie	SALMON
Clinique de Chirurgie Thoracique	DOR
Clinique Dermatologique	HADIDA
Clinique d'Endocrinologie	VAGUE
Clinique Exotique	BLANC
Clinique Médicale	N...
Clinique Médicale	AUDIER
Clinique Médicale Thérapeutique et des Maladies du Sang	OLMER
Clinique des Maladies infectieuses	RAYBAUD
Clinique des Maladies des voies disgestives et de la nutrition	MONGES H
Clinique Médicale infantile	BERNARD R.
Clinique de Neurologie	BOUDOURESQUES
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologie	SERMENT
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	APPAIX
Clinique Pneumo-Phtisiologique	CHARPIN
Clinique psychiatrique	SUTTER
Clinique Rhumatologique	RECORDIER
Clinique Stomatologique	LACHARD
Clinique Urologique	DUCASSOU

Electroradiologie	LEGRE
Histologie et Embryologie	PICARD
Histologie et Embryologie	STAHL
Hygiène et Médecine sociale	SAUTET
Médecine expérimentale	DONNET
Médecine légale et Médecine du travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie Chirurgicale	GRANJON
Pathologie Interne	MOUREN
Pharmacie Chimique	CRISTAU
Pharmacie Galénique et Matière Médicale	BERNARD P.
Pharmacologie Pharmaceutique	MERCIER J.
Physiologie	MORIN
Physiopathologie des voies respiratoires	LAVAL
Physique	DUBOULOZ
Physique Médicale	ROUX
Thérapeutique	N...
Zoologie et Microbiologie	GREBUS
Toxicologie	VIALA

PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM. BOUGEON René	Chirurgie
FARNARIER	Ophtalmologie
HOUEL	Chirurgie thoracique et Chirurgie du cœur
IMBERT	Chirurgie Générale
LAFFARGUE	Anatomie Pathologique
ORSINI	Pédiâtrie
PAYAN	Anatomie Pathologique
SERAFINO	Chirurgie
TAMALET	Microbiologie
TISSIE	Oto-Rhino-Laryngologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	MM.	MM.
DESPIEDS	CORRIOL	JULLIEN
DESANTI	BARET	DALMAS
GEVAUDAN	GHIGLIONE	

MAITRES DE CONFERENCES — AGREGES

MM.	MM.	MM.
ACHARD	CODACCIONI	GAYTE-SORBIER
ARDISSON	COMBALBERT	GERARD
ARNOUX A.	COURBIER	GIRAUD F.
BATTESTI	CREVAT	GRIMAUD
BERNARD P.M.	DELMONT	GUERINEL
BOUYALA	DOR	HUGUET
BIMAR	DUMON	IMBERT Paul
BUISSON	FRANÇOIS	Mme JOUVE
BUREAU	FOURNIER	KAPHAN
CARCASSONNE M.	GARCIN	LANZA Maurice
CLAUSTRE	GAUTHIER	
CHEVROT	GASCARD	

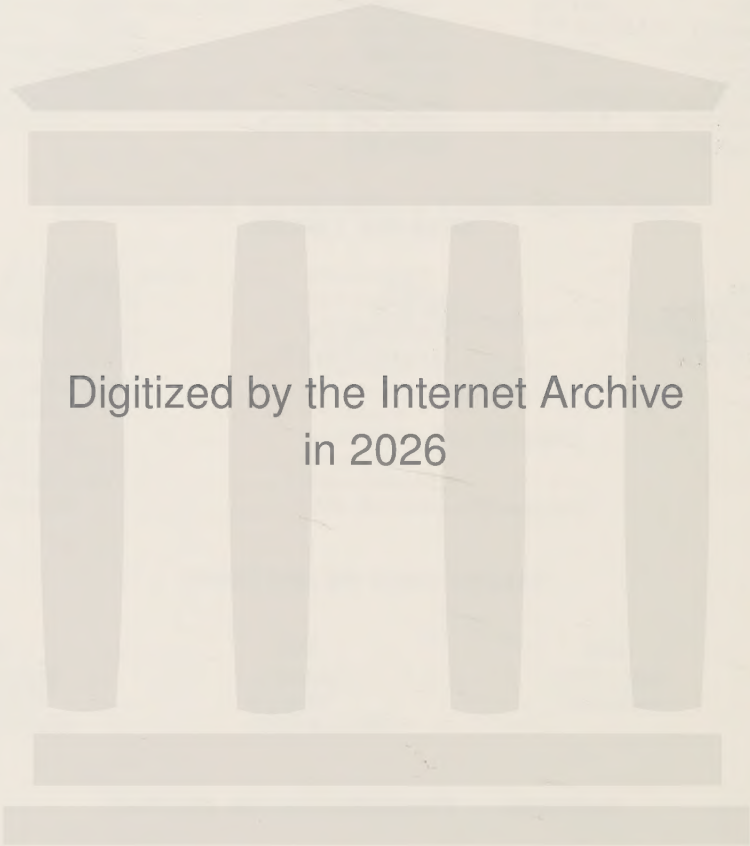
MM.	MM.	MM
LOUCHET	RICHAUD	SOULAYROL
MONGIN	RICHELME	SPITALIER
MONTIES	ROLLAND	TARANGER
MURATORE	SALAMON	TATOSSIAN
NICOLI	SARACCO	TOGA
PLASSE	SARLES	VITRY
RAYBAUD C.	SEDAN	ZWIRN
REYNAUD	SEITE	

AGREGES EN EXERCICE

MM.	MM.	MM.
BERARD	COMITI	RUF
BREMOND	GARES	SIMONIN
BRICOT	JEAN	TEMINE
CARCASSONNE Y	MICHOTEY	TRIFAUD
CASANOVA	MONGES André	
COIGNET	REBOUD	

AGREGES LIBRES

MM.	MM.	MM.
BERTHIER	DEVIN	OLLIVIER
BOURRET	FIGARELLA	OURGAUD
CHAUVIN	GAMBARELLI	PAOLI


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545823_0062

A MES PARENTS

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur DUMAZERT,

qui nous a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire.

Il nous a fait l'honneur de présider notre Jury de Thèse.

Nous lui exprimons toute notre gratitude.

Monsieur le Professeur PELLISSIER,

Nous lui exprimons notre reconnaissance pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger notre travail.

Monsieur le Professeur MERCIER,

Nous le remercions pour avoir bien voulu accepter de faire partie de notre Jury de Thèse.

Monsieur le Professeur GHIGLIONE,

Nous le remercions pour les précieux conseils et les encouragements qu'il nous a prodigués et pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'être parmi nos juges.

A Monsieur le Docteur L. VOVAN

Assistant des Hôpitaux

A Monsieur R. ITIE

Interne en Pharmacie des Hôpitaux

Avec nos sincères remerciements.

A TOUS MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE CHIMIE DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE.

INTRODUCTION

NUCLEOTIDES DES HEMATIES

Bien que le premier nucléotide des hématies (l'adenosine monophosphate) soit identifié depuis 1914, les travaux sur les nucléotides libres de ces cellules sont de date relativement récente. Dans la majorité des cas, chez l'Homme, on se borne à étudier l'adénosine triphosphate (ATP) dans différentes affections sphérocytaires. Parmi ces travaux, nous citons ceux de Mohler et coll. (23), de Jacobs et coll. (17), de Brewer et coll. (4) et ceux de Zurcher et coll. (33). Ces auteurs se contentent d'évaluer les teneurs en ATP des hématies et partant des notions qui en découlent, ils ébauchent des hypothèses concernant le mécanisme de l'hémolyse dans ces affections.

On ne découvre l'existence des autres nucléotides de l'adénine qu'à l'occasion de l'étude du métabolisme du phosphore intra-érythrocytaire (Prankerd, 27) et du métabolisme des glucides (Barlett, 1 et Prankerd, 26) ou de l'étude de la physiopathologie d'une anémie hémolytique non sphérocytaire (Lelong et coll., 19).

C'est surtout à Mandel et Chambon (20) que revient le mérite d'avoir démontré pour la première fois que les hématies humaines renferment d'autres nucléotides acido-solubles en plus des dérivés adényliques et des nicotinamides adenine-nucléotides déjà connus. Nous leur devons également l'établissement des valeurs normales de différents nucléotides dans les hématies humaines.

A la suite des travaux de Mandel et coll., d'autres auteurs (32) ont étudié les variations et la répartition des nucléotides libres dans les hématies du sang normal et au cours des maladies diverses. Les valeurs de différents nucléotides ont été établies dans le sang humain chez les adultes des deux sexes, chez l'enfant, et dans le sang du cordon (Vovan, 31). On note que les taux des nucléotides varient très peu chez l'Homme, quel que soit l'âge et quel que soit le sexe. Par contre, le sang du cordon renferme des quantités de nucléotides nettement inférieures à celles trouvées chez l'enfant ou chez l'adulte.

Au cours d'affections diverses : leucose aiguë, porphyrinurie congénitale, anémies hémolytiques constitutionnelles, les taux de

différents nucléotides, en particulier, ceux des nucléotides adényliques subissent des variations sensibles (32).

Abordant l'étude plus poussée de la répartition des nucléotides dans les hématies au cours des anémies hémolytiques constitutionnelles, Vovan (31) distingue deux types d'anémies : les anémies présentant une teneur élevée en ATP et un rapport ATP/ADP augmenté par rapport à la normale : ce sont surtout des anémies dues à la fragilité membranaire (maladie de Minkowski-Chauffard) et les enzymopénies (Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase) — les anémies par trouble de l'hémoglobinosynthèse (thalassémie) et par trouble corpusculaire de l'hémoglobine (drépanocytose par exemple) ; ces anémies présentant une diminution des nucléotides et en particulier de l'ATP et du rapport ATP/ADP.

Ces travaux, malheureusement peu nombreux, montrent néanmoins la corrélation qui existe entre la répartition des nucléotides libres des hématies et des affections sanguines dont le globule rouge est le siège. Ceci n'a rien d'étonnant, car on sait désormais le rôle important joué par les nucléotides libres dans le métabolisme intermédiaire. L'analyse de ces composés pourrait fournir un indice précieux de l'activité métabolique qui règne dans une cellule ou dans un tissu.

Cette propriété a été mise à profit pour la première fois par Chambon et Mandel (6) pour évaluer les effets biochimiques des rayons X sur le globule rouge. En effet, ces auteurs, en déterminant les teneurs en nucléotides libres des hématies des rats soumis aux radiations, constatent au 7^{me} jour de radiation, une réduction du taux d'ATP, une baisse très importante de guanosine triphosphate, de guanosine diphosphate et d'uridine diphosphate-coenzyme.

Remenchik et coll. (28), pour leur part, notent une augmentation des nucléotides adényliques des érythrocytes de Rat rendu hypertendu expérimentalement.

Ces données nous suggèrent l'idée d'étudier les effets de certaines substances érythro- et leucocyto-toxiques, en déterminant les teneurs en nucléotides libres des hématies des rats soumis au traitement par ces substances.

Nous avons choisi, pour cette étude, la phénylhydrazine dont l'introduction dans l'organisme déclanche une anémie sévère et qui a été souvent servie pour l'étude des anémies expérimentales, et deux antimitotiques : le 6-mercaptopurine (purinéthol) et le cyclophosphamide (Endoxan) utilisés largement à l'heure actuelle dans le traitement des leucoses aiguës.

L'étude du métabolisme érythrocytaire ne saurait se passer de l'examen d'un organe du système réticulo-endothélial : la rate dont on connaît l'influence sur la moelle osseuse. Cette influence peut être directe : elle peut être indirecte en ce sens que la rate influence la disparition de divers éléments figurés du sang, influençant par contre-coup la fonction médullaire.

En effet, les travaux de Heilmeyer (13) permettent de conclure que l'influence humorale de la rate sur la moelle osseuse est de nature double : les influences spécifiques et les influences non spécifiques. Les influences spécifiques sont irréversibles. Elles touchent uniquement la maturation normale des érythrocytes perturbés dans l'élimination du noyau et dans la synthèse de l'hémoglobine. Ces fonctions demeurent après splénectomie, et cela durablement. Les influences non spécifiques agissent sur la régulation des éléments figurés dans le sang périphérique. La splénectomie entraîne régulièrement une perturbation dans le nombre des érythrocytes, soit dans le sens plus, soit dans le sens moins, tandis que le nombre des leucocytes est constament augmenté.

Telles sont les raisons pour lesquelles nous complétons notre étude des nucléotides des hématies par l'analyse des nucléotides de la rate, dans l'espoir de mettre en évidence les relations métaboliques qui pourraient relier les deux éléments importants du système hématopoïétique.

Avant de présenter nos travaux, il nous paraît utile de décrire les caractéristiques des substances utilisées : la phénylhydrazine, la 6-mercaptopurine et le cyclophosphamide.

LA PHENYLHYDRAZINE

L'étude des anémies expérimentales déclanchées par l'introduction dans l'organisme de substances toxiques utilise le plus souvent la phénylhydrazine. En effet cette substance retient l'attention de la plupart des expérimentateurs à cause de l'intérêt théorique et pratique que présentent les résultats obtenus avec cette anémie pour élucider certains problèmes de la synthèse de l'hémoglobine. En outre, son utilisation est commode : établissement rapide de l'anémie et constance du degré de l'anémie.

De nombreux auteurs utilisent l'anémie à la phénylhydrazine pour étudier l'effet de substances réparatrices des anémies. C'est ainsi que Erdos (11) guérit l'anémie à la phénylhydrazine par des préparations de foie et de cobalt. Gajdos (13) pour sa part, montre l'action antianémique de la méthionine sur des Rats anémiés par la phénylhydrazine.

Sur le plan théorique, Koritz et Chantrenne (18) se servent de cette anémie pour aborder un problème de mécanisme, à savoir le rôle de l'acide ribonucléique dans l'incorporation in-vitro du glycocolle radioactif dans les protéines des réticulocytes.

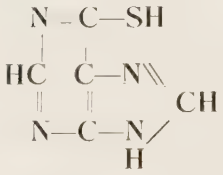
Mandel et ses collaborateurs (20) démontrent que l'augmentation des nucléosides triphosphates (ATP et GTP) chez les rats anémiés par la phénylhydrazine est due à la décharge abondante des réticulocytes dans le torrent circulatoire.

L'action de la phénylhydrazine se traduit sur le plan hématologique par une diminution brutale et rapide du taux d'hemoglobine et du nombre de globules rouges. D'autre part, du fait de la

diminution beaucoup plus accentuée du nombre de globules rouges que celle du taux d'hémoglobine, la valeur globulaire se trouve augmentée. Il s'agit donc d'une anémie hyperchrome. Elle est accompagnée d'une réticulocytose intense. L'examen des frottis sanguins révèle une forte anisocytose et poïkilocytose (Meyer, 22).

LA 6-MERCAPTOPURINE

La 6-mercaptopurine, connue sous le nom de Purinéthol se prépare à partir de l'hypoxanthine par action du pentasulfure de phosphore. Elle a pour formule brute $C_5H_4N_4S$. Sa formule développée est la suivante :



Elle se présente sous forme de cristaux jaunes solubles dans 400 parties d'eau bouillante. C'est un analogue chimique de l'adenine et de l'hypoxanthine.

La 6-mercaptopurine est un antagoniste structural des bases puriques, c'est-à-dire un corps suffisamment proche de ces bases pour pouvoir s'unir au même système enzymatique ; il est suffisamment dissemblable pour ne pas avoir la même action métabolique, bloquant ainsi la synthèse des acides nucléiques.

Action biochimique de la 6-mercaptopurine

Chez le *Lactobacillus casei*, Elion et Hitching (10) ont montré que la 6-mercaptopurine inhibe le développement du microorganisme dans un milieu de culture contenant de l'acide folique. Ce développement est rétabli lorsqu'on incorpore dans le milieu des purines naturelles : adenine, guanine, xanthine ou hypoxanthine. Il semble que la 6-mercaptopurine interfère dans la conversion de l'adenine en guanine en passant pas l'hypoxanthine et que le mutant ne possède pas d'équipement enzymatique pour transformer l'hypoxanthine en guanine.

Elion et Balis (9) indiquent, en outre que L. casei peut utiliser quelques-unes des purines physiologiques pour le développement et l'interconversion des restes puriques en des constituants adényliques et guanyliques des acides nucléiques.

Confirmant les travaux de Elion et de Balis, Skipper (29) montre que la 6-mercaptopurine empêche l'utilisation de l'hypoxanthine pour la synthèse des purines de l'acide nucléique dans les tissus intestinaux de la souris.

Il est important de noter la facilité avec laquelle la 6-mercaptopurine se substitue comme dans les réactions enzymatiques concernant le métabolisme des purines. C'est ainsi que la 6-mercaptopurine est rapidement oxydée par la xanthine-oxydase en acide 6-thiourique. En présence de désoxyriboside-1-phosphate, elle a servi de substrat pour la nucléoside-phosphorylase : il se forme de la 6-mercaptopurine-désoxyriboside (Friedklin, 12).

Il est à noter que la 6-mercaptopurine exerce une action toxique plus élevée sur les tumeurs que sur les tissus normaux. On pense que cela est dû à la biosynthèse plus accélérée des acides nucléiques dans le tissu tumoral.

Toxicité expérimentale et pharmacologie

Chez la Souris et chez le Rat, la DL 50 par voie intra-péritonéale est de 225 mg/kg en une seule injection.

Par voie orale, en une seule prise, la DL 50 est 50 à 70 fois plus élevée.

Avec des doses répétées, la DL 50 par voie intra-péritonéale est de 98 mg/kg par jour pendant 5 jours chez la Souris, 59 mg/kg par jour chez le Rat.

L'étude de l'absorption et de la diffusion a été faite avec la 6-mercaptopurine marquée, administrée par os en une dose unique. Le médicament diffuse lentement dans les cellules et y demeure environ deux semaines ; il diffuse également dans le liquide céphalorachidien et est excrété par les urines (radioactivité encore présente au 35ème jour).

Indications thérapeutiques

Depuis son introduction dans la thérapeutique, en 1953, la principale indication de la 6-mercaptopurine reste le traitement des *leucoses aiguës*. Dans les leucoses aiguës, lymphoblastiques l'utilisation de la 6-mercaptopurine dans le traitement d'entretien peut se faire suivant trois méthodes :

— méthode dite réinduction systématique : dès l'arrêt du traitement d'attaque cortisonique, la consolidation se poursuit pendant trois semaines avec la 6-mercaptopurine à la dose de 2,5 mg/kg/jour par os ;

— méthode dite "VAMP" : on associe la Vincristine, l'Améthopérine, la 6-mercaptopurine et la Prednisone.

— méthode séquentielle ou itérative : on associe successivement chacun des médicaments : améthopérine, 6-mercaptopurine, Vincristine, Cyclophosphamide, Vincaleucoblastine, méthyl-glyoxal bis-guanyl-hydrazone. Entre chaque cure, s'intercale un traitement d'un mois par la Prednisone.

Dans les leucoses myéloblastiques et leucoses myéloïdes chroniques, le traitement d'attaque associe la 6-mercaptopurine (2,5 mg/jour, per os) au Méthyl-glyoxal-bis-guanyl-hydrazone. Le traitement d'entretien quotidien utilise la 6-mercaptopurine.

En cancérologie, la 6-mercaptopurine, en association avec d'autres cytostatiques, a été utilisée dans la thérapeutique des cancers broncho-pulmonaires par l'Ecole d'Etienne Bernard. Sous contrôle hématologique, le traitement d'entretien comporte 50 mg deux fois par semaine en association avec d'autres cytostatiques tels que la méthotrexate et le cyclophosphamide, en injection intramusculaire.

Enfin, les indications de la 6-mercaptopurine, en dehors des hémopathies malignes et des autres cancers, sont celles d'un produit *immuno-suppresseur.* A ce titre, elles est prescrite en pathologie rénale dans les greffes rénales et dans les syndromes néphrotiques.

Effets secondaires

La surveillance hématologique du malade doit être fréquente. Le traitement doit être interrompu si le nombre de leucocytes descend au-dessous de 5.000/mm3 et repris dès que ce chiffre est à nouveau dépassé.

Anémie, thrombocytopénie et hémorragie sont signalées mais plus rares. On note parfois des accidents toxiques : troubles gastro-intestinaux et ulcérations de la muqueuse buccale.

EN CONCLUSION, la 6-mercaptopurine, connue sous le nom de purinéthol est utilisée à l'heure actuelle dans le traitement des leucoses aiguës principalement. La dose couramment adoptée est de 2,5 mg par kg et par jour, par voie orale. Son association avec d'autres antimitotiques ou antimétabolites dépend des techniques employées et des auteurs.

De toute façon, c'est une médication agressive. Elle doit être accompagnée de thérapeutiques symptomatiques énergiques, et surtout, elle doit être sous contrôle hématologique vigilant afin de déceler l'apparition des premiers effets secondaires.

LE CYCLOPHOSPHAMIDE

(Endoxan)

La chimiothérapie anti-cancéreuse utilise des produits chimiques qui sont véhiculés par voie sanguine et diffusés dans tous les tissus cancéreux. Elle représente un traitement clinique général. Malheureusement, la toxicité souvent très puissante des agents chimiques cytostatiques limite l'administration.

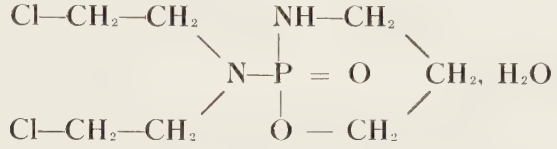
Certains chercheurs ont pensé utiliser les propriétés particulières des cellules tumorales et, notamment leur production anormale de certains enzymes. Ils ont préconisé la synthèse de substances de "transit" inactives et peu toxiques, susceptibles de libérer dans l'organisme leurs radicaux actifs uniquement au contact des cellules malignes.

Le cyclophosphamide fait partie de ces substances.

Synthétisé en 1957 par Arnold et Bourseaux, le cyclophosphamide ou N.N. bis (β-chloréthyl) N'O-propylène phosphoramide est un ester phosphamidé cyclique de moutarde azotée.

Il a pour formule brute : $C_7H_{15}N_2O_2PCl_2H_2O$

Sa formule développée est la suivante :



Il est commercialisé sous le nom d'ENDOXAN.

Il se présente sous la forme de cristaux blancs, stables à la température ordinaire. Si l'eau de cristallisation est enlevée (sous vide et en présence de déshydratants), il se transforme en corps huileux semi-liquide. Au contact de l'air humide, il prend une molécule d'eau et retrouve la forme cristallisée.

Le cyclophosphamide est soluble jusqu'à 4 p. 100 dans l'eau, soluble dans l'alcool éthylique, le chloroforme, le dioxane, l'éthylène et le propylène-glycol.

Toxicité et pharmacodynamie

Le cyclophosphamide constitue une forme inactive de transport des groupements "β-chloréthyl", éléments cytostatiques et cytotoxiques des moutardes azotées.

Le métabolisme intense et particulier des cellules cancéreuses provoque la sécrétion abondante des phosphatases et des phosphamidases.

Introduit dans l'organisme, le cyclophosphamide libère des groupements actifs en présence de ces enzymes.

Le cyclophosphamide est relativement peu toxique. Sa DL 50 est de 160 mg/kg I.V. chez le Rat, 400 mg/kg I.V. chez le Cobaye, 150 mg/kg I.V. chez le Lapin et 40 mg/kg I.V chez le Chien.

Le cyclophosphamide est actif dans le traitement des tumeurs expérimentale du Rat. Baylin (2) montre que le carcinome de Guérin présente une certaine chimio-sensibilité au cyclophosphamide Le phénomène est d'autant plus marqué que la théraeuti-

que est plus tôt instaurée : les résultats les meilleurs sont obtenus quand on traite les animaux dès le jour où ils sont greffés. Dans ce cas, le produit entraîne un certain retard dans l'évolution globale de la tumeur.

Chez les Rats opérés de leur tumeur 13 jours après la greffe, on a observé, chez ceux traités par le cyclophosphamide des récidives peu importantes par rapport à celles des témoins. L'observation la plus importante est que les relais ganglionnaires, chez les animaux traités, se sont montrés indemnes de toute métastase.

Les effets secondaires chez l'animal sont loin d'être négligeables : lésions spléniques avec disparition de la pulpe blanche, leucopénie sanguine, lésions hépatiques (Biraben et Delmon, 3).

Etudiant l'action comparée du cyclophosphamide chez le Rat, Chevallier et Coll. (7) notent des différences très nettes entre l'influence de l'Endoxan et celle de l'irradiation par les rayons X. Les rayons X donnent une destruction des éléments cellulaires plus rapide, plus brutale que celle déterminée par le cyclophosphamide. Quant à la restauration, elle est aussi plus rapide et plus complète avec les rayons X.

Dubois-Ferrière et coll. (8) procèdent, quant à eux, aux essais expérimentaux sur la leucémie de la souris Ak.

Les souris de souche Ak font, spontanément, une leucémie lorsqu'elles arrivent vers le huitième mois de leur existence. Si vers le deuxième ou le troisième mois, on leur injecte 8 à 10 millions de cellules leucémiques, on déclanche une leucémie aiguë entraînant la mort, en dix à vingt jours ; cette forme de leucémie est difficile à influencer. Chez une série de souris Ak traitées par deux injections hebdomadaires d'un mg de cyclophosphamide par voie sous-cutanée, ces auteurs ont obtenu un prolongement de la survie de 50 p. 100.

Indications thérapeutiques

Le cyclophosphamide peut légitimement être essayé dans toutes les affections malignes inaccessibles à un traitement curatif. Les métastases de cancers du sein peuvent être améliorées de façon intéressante. Il en va de même pour les cancers de bronches.

L'indication de choix semble être constituée par les sarcomes. Mais, il ne faut pas s'attendre à de bons résultats dans les épithéliomas digestifs.

Le cyclophosphamide s'administre de préférence par voie intraveineuse. Les voies intra-musculaires et locales peuvent être utilisées. On aura recours à la voie buccale au cours des traitements prolongés et des cures d'entretien.

Les doses à prescrire ont un caractère strictement individuel. Elles dépendent du potentiel évolutif de la tumeur, des réactions organiques générales et de la numération leucocytaire.

Signalons que le traitement d'attaque utilise 100 mg par jour pendant quatre jours par voie veineuse. Au cours du traitement d'entretien, on prescrit 200 mg tous les deux jours puis tous les trois jours.

Effets secondaires

Le cyclophosphamide est en général bien toléré et facilement maniable.

Des signes généraux discrets d'intolérance sont fréquemment rencontrés au décours de l'injection : vertiges, céphalées, nausées, en général facilement jugulées par des antiémétiques.

L'alopécie est un accident assez fréquent, mais la repousse est de règle dans les trois ou quatre mois qui suivent l'arrêt du traitement.

Les accidents sanguins sont les seuls importants. On note, en effet, des leucopénies qui oscillent entre 2.000 et 4.000 leucocytes par mm3, mais restent transitoires. Le taux d'hématies et le taux d'hémoglobine sont peu modifiés

En règle générale, une leucopénie atteignant 3.000 globules blancs commande l'arrêt momentané de la médication.

⁂

Cette brève étude bibliographique a montré que les substances antitumorales telles que la 6-mercaptopurine et la cyclophosphamide constituent des médicaments puissants et agressifs dans le traitement des hémopathies malignes et des cancers. Leur utilisation thérapeutique doit être contrôlée d'une manière vigilante car les effets secondaires qu'ils engendrent sont loin d'être négligeables et ne doivent pas être négligés.

Pour ce faire, on a généralement pris comme critère la leucopénie. Si celle-ci reste un test sensible, elle ne saurait révéler d'emblée l'importance des lésions. De plus, la leucopénie ne fournit qu'un témoignage indirect de l'atteinte des cellules des organes hématopoïétiques en permanente multiplication et ne permet pas de dégager les répercussions des antitumoraux sur le métabolisme intracellulaire.

L'étude des globules rouges est intéressante car deux possibilités s'offrent à l'expérimentateur. L'une concerne les modifications des activités enzymatiques, l'autre l'analyse de l'état d'équilibre cellulaire que révèle la répartition des divers constituants ou métabolites.

L'on sait désormais le caractère d'indice de l'activité métabolique que représentent les variations des nucléotides libres. C'est pourquoi, nous avons orienté notre étude sur l'analyse des nucléotides des hématies.

PLAN DU TRAVAIL

Nous décrirons dans le premier chapitre le matériel biologique et les techniques analytiques utilisées dans ce travail.

Nous étudierons, dans le deuxième chapitre, la répartition des nucléotides libres dans les hématies de Rat sain.

Dans le troisième chapitre, nous verrons les effets de l'administration de la phénylhydrazine sur la répartition des nucléotides des hématies de Rat. Cette étude sera accompagnée de l'analyse des nucléotides spléniques.

L'influence exercée par la 6-mercaptopurine et le cyclophosphamide, deux puissants antitumoraux, sur les nucléotides érythrocytaires et spléniques sera étudiée respectivement dans le quatrième et le cinquième chapitre.

Enfin, dans nos conclusions, nous essaierons d'interpréter les résultats donnés par ces expériences.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

MATERIEL D'ETUDE ET TECHNIQUES

Notre étude porte d'une manière générale sur des lots de six rats blancs de souche Wistar, homogènes, provenant d'une même génération. Leur poids varie entre 220 et 250 g.

Les animaux reçoivent une nourriture équilibrée, soit préparée par nos soins, soit achetée dans le commerce (aliments pour animaux U.A.R.). Ils consomment en moyenne 10 g de nourriture par rat et par jour.

A la fin de l'expérience, les animaux sont sacrifiés par décapitation. On recueille leur sang dans un tube à centrifuger contenant quelques gouttes d'héparine et plongé dans un bain de glace. Le sang des animaux constituant chaque lot est ensuite soumis à la centrifugation à 3.000 t/minute pendant 10 minutes. On sépare ainsi les hématies du plasma. On lave ensuite les hématies par un volume de solution à 9 p. 1.000 de chlorure de sodium. On ajoute enfin, deux volumes d'eau glacée pour les hémolyser.

Extraction des nucléotides

A l'hémolysat ainsi obtenu, on ajoute un volume d'acide trichloracétique à 10 p. 100 et on agite soigneusement le contenu. Après centrifugation à 4.000 t/minute pendant 10 minutes, on sépare le liquide surnageant. On reprend le sédiment par son volume d'acide trichloracétique à 5 p. 100 et on répète l'opération. On réunit les deux surnageants et on enlève l'excès d'acide trichloracétique par quatre lavages à l'éther sulfurique refroidi à —15°C. On porte la solution de nucléotide à pH = 8 par addition d'ammoniaque diluée et l'on procède à leur séparation.

Séparation des nucléotides libres

On réalise la séparation des nucléotides libres et autres composés acido-solubles à partir de l'extrait trichloracétique neutralisé par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions Dowex 1 x 8 selon la méthode de HURLBERT et coll. (16). Nous utilisons les colonnes de verre de 0,8 cm de diamètre et de 18 cm de hauteur.

L'extrait neutralisé contenant les nucléotides est passé sur la résine Dowex 1 × 8, 200-400 mailles convertis en formiate selon

la technique décrite par Grégoire et coll. (14) avec un débit de 0,6 ml/min/cm2 de section de colonne. On lave ensuite avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent présente une densité optique inférieure à 0,1 à $\lambda = 260$ mμ.

On élue les nucléotides par des solutions croissantes en acide formique et en formate d'ammonium. On utilise, à cet effet, le dispositif représenté sur la figure n° 1. Le gradient d'élution est de forme convexe. A tous les stades de fractionnement, les colonnes sont maintenues à la température de + 4°C par immersion dans un bain thermostatique réfrigéré.

Les éluats provenant de la colonne sont évalués par leur absorption dans l'ultra-violet. Cette mesure d'absorption est assurée par un dispositif à fonctionnement automatique Uvicord LKB 4700 A. Relié directement à l'office d'écoulement de la colonne, cet élément mesure, et, en liaison avec un enregistreur E, enregistre en continu les variations d'absorption, révélant ainsi la présence des constituants au fur et à mesure de leur apparition. La longueur d'onde employée est de 253 mμ.

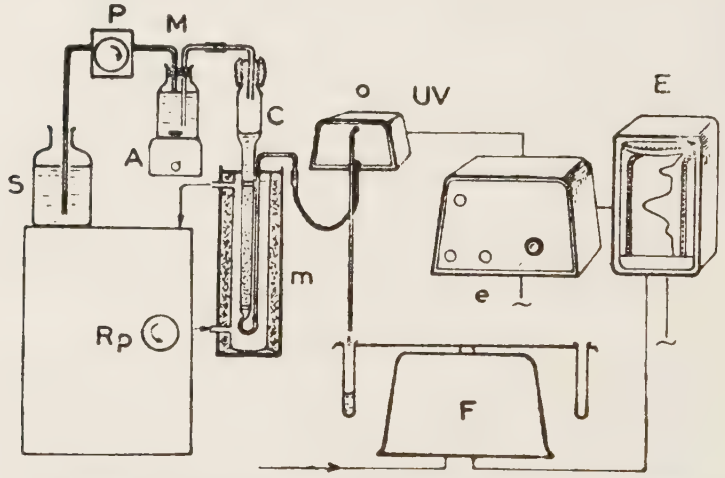


Fig. 1. — Dispositif utilisé pour la chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions avec enregistrement automatique de l'absorption UV des éluats.

Rp : Réfrigérateur de Laboratoire avec pompe incorporée.
S : Fiole contenant le solvant concentré.
P : Micropompe.
M : Flacon mélangeur de 500 ml de capacité.
A : Agitateur magnétique.
C : Colonne de résine plongée dans le manchon *m*, dans lequel circule un fluide thermostaté.
UV : Elément Uvicord, indicateur d'absorption ultra-violette composé d'un élément optique *o* et d'un élément électrique *e* d'absorption.
E : Enregistreur à courant continu relié à l'indicateur d'absorption.
F : Collecteur de fractions automatique fonctionnant à temps constant.

Evaluation des nucléotides

Afin de nous permettre une évaluation de chaque fraction de nucléotide, nous déterminons la densité optique des éluats recueillis par fraction de 5 ml à l'aide d'un collecteur automatique fonctionnant à temps constant F, à la longueur d'onde de 260 mμ au spectrophotomètre manuel, cuve de quartz de 1 cm d'épaisseur. On établit les diagrammes d'élution en portant en abscisses les volumes d'éluat et en ordonnées, les densités optiques.

Ce moyen nous permet, d'une part, par le dispositif d'enregistrement automatique de suivre l'apparition des fractions et d'agir sur l'évolution du gradient afin de perdre le minimum de temps, et d'autre part, par la mesure manuelle à $\lambda = 260$ mμ de faire une étude quantitative.

On évalue avec une très bonne approximation la quantité de chaque nucléotide individualisé sur le chromatogramme, en faisant intervenir le volume total de chaque fraction ainsi que le coefficient d'extinction moléculaire propre à chaque catégorie de nucléotide. Ces coefficients déterminés en milieu acide sont les suivants : (Pabst Circular OR-10)

— dérivés de l'adenosine ..... $14{,}4.10^3$
— dérivés de la guanosine ..... $11{,}8.10^3$
— dérivés de l'uridine ..... $9{,}9.10^3$
— dérivés de la cytidine ..... $6{,}3.10^3$

Concentration et purification des nucléotides

Par adsorption sur charbon actif : les fractions correspondant à un même pic sont concentrées et purifiées par adsorption quantitative sur charbon actif et élution par l'éthanol aqueux ammoniacal.

On met le charbon « Activit 50 XL » activé dans une colonne de 1 cm de diamètre intérieur. La solution de nucléotides filtre lentement à travers le charbon. Après lavage de la colonne par écoulement continu, à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage soit neutre, on élue les nucléotides à l'aide de quelques millilitres d'une solution d'alcool à 50 p. 100 contenant pour 100 ml, 0,3 ml d'ammoniaque concentrée.

L'éluat contenant les nucléotides est concentré sous dessicateur sur du chlorure de calcium et de l'anhydride phosphorique.

Cette opération se déroule en chambre froide.

Par chromatographie préparative sur papier : la solution de nucléotides concentrée à petit volume est déposée sur une bande étroite à la partie supérieure d'une feuille de papier Whatman 3 MM. Le chromatogramme est développé avec le solvant n° 1 (voir plus loin). Chaque zone absorbant dans la lumière ultra-violette

est révélée sous lampe UV à la longueur d'onde de 257 mμ et découpée et éluée à l'eau.

On obtient ainsi les nucléotides parfaitement purs pour être soumis à leur identification.

Identification des nucléotides

L'identification des nucléotides repose sur un ensemble de données qualitatives et quantitatives. Ce sont :

— l'ordre d'apparition des nucléotides lors de la chromatographie sur colonne ;

— la nature de leur spectre d'absorption dans l'ultraviolet à différents pH (1, 7 et 13) ;

— le comportement des nucléotides à la chromatographie sur papier et sur couche mince par comparaison avec des nucléotides de référence (Pabst) ;

— l'analyse chimique.

Spectrophométrie dans l'ultra-violet. — On utilise les cuves de quartz d'un centimètre d'épaisseur. Les spectres sont déterminés sur des quantités de nucléotides inférieures ou égales à 0,1 μmole/ml, dans les limites de longueur d'onde comprises entre 220 et 318 mμ, soit manuellement, soit par enregistrement automatique. Les spectres d'absorption des substances étudiées sont comparées avec les spectres caractéristiques et classiquement connus de chaque catégorie de nucléotides.

Chromatographie sur papier. — Nous utilisons le papier Whatman n° 1 ou Whatman 3MM. La quantité de nucléotide déposé est de l'ordre de 0,1 μmole. La durée de migration varie de 24 à 40 heures. L'emplacement des nucléotides après leur migration sur les chromatogrammes est révélé grâce à une lampe UV (longueur d'onde 257 mμ).

Chromatographie sur couche mince. — Nous utilisons la cellulose avec plâtre MN 300G étalée sur couche de 0,25 mm sur des plaques de verre de 10 x 20 cm. La durée de migration est de 90 minutes. Cette technique permet de séparer le CMP et le DPN, obtenus en très petites quantités. Elle a en outre le mérite d'être rapide. Néanmoins, elle ne permet pas, comme c'est le cas de la chromatographie sur papier, de récupérer le nucléotide pour des fins analytiques puisque les quantités de substance déposées sont très faibles (5 microgrammes).

Pour ces deux types de chromatographie, les solvants suivant sont utilisés :

— solvant n° 1 : Ethanol 95° - Acétate d'ammonium M pH 7,5 (7,5 : 3 v/v)

— solvant n° 2 : Acide isobutyrique - ammoniaque concentré - eau (66 : 1 : 33 v/v)

— solvant n° 3 : n-Butanol - acétone - acide acétique - ammoniaque à 5 p. 100 - eau (3,5 : 2,5 : 1,5 : 1,5 : 1).

Les oses migrant sur les chromatogrammes sur papier sont mises en évidence à l'aide des réactifs au phtalate d'aniline (25), au nitrate d'argent en milieu alcalin, au naphtorésorcinol (30).

Analyse chimique. — Le phosphore est dosé par la méthode de Briggs (5) après minéralisation de la substance par l'acide sulfurique concentré en présence de quelques gouttes de perhydrol

Le ribose est dosé par la méthode colorimétrique de Mejbaum (21).

L'identification de la nitotinamide adenine dinucléotide (NAD) et de la nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (NADP) repose sur leur comportement chromatographique sur colonne, sur leur spectre d'absorption dans l'ultra-violet, en présence du cyanure de potassium. En effet, en présence du cyanure de potassium et à pH = 11, les dérivés de la nicotinamide se transforment en composés réduits et présentent un second maximum d'absorption à 327 mμ.

Analyse de la rate. — Après le sacrifice des rats et le prélèvement de leur sang, nous réunissons les rates de chaque lot. Les rates sont pesées puis mises à congeler immédiatement à —18°C. On extrait les nucléotides libres par broyage au Bülher en présence d'un volume d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Une seconde extraction effectuée sur le sédiment obtenu après centrifugation utilise l'acide trichloracétique à 5 p. 100. Le reste de l'opération se déroule d'une manière identique à celle décrite plus haut à propos des nucléotides des globules rouges.

Hémogramme. — Avant, pendant et à la fin d'une expérience, nous pratiquons chez le Rat un hémogramme comportant notamment :

— Le nombre de globules rouges par mm3

— le nombre de globules blancs par mm3

— la quantité d'hémoglobine pour 100 ml de sang

— le pourcentage de réticulocytes dans le sang circulant.

Le sang est prélevé après section franche de la queue du rat. Nous utilisons les techniques classiques d'hématologie pour déterminer l'hémogramme.

CHAPITRE DEUXIEME

NUCLEOTIDES LIBRES DES HEMATIES DES RATS SAINS

Nos expériences portent sur des lots de six rats adultes pesant entre 180 g et 220 g. Les animaux ont reçu une alimentation synthétique normale (aliments pour Rats U.A.R.).

Deux essais ont été effectués. Nous représentons sur la figure n° 2 un exemple de diagramme correspondant à la chromatographie sur résine échangeuse d'anions des nucléotides libres des globules rouges de rats sains.

On peut y noter l'existence de dix fractions principales désignées par les lettres allant de A à J. Ces fractions sont, pour la plupart, homogènes. L'analyse a permis de reconnaître le principal constituant des fractions hétérogènes (abréviation notée en tête de chaque pic).

Identification des fractions

Fraction A. — La fraction A présente un spectre d'absorption dans l'ultraviolet en milieu acide et en milieu alcalin caractéristique des dérivés de cytidine. Son comportement chromatographique (sur colonne et sur couche mince) permet de l'identifier au cytidine monophosphate (CMP).

Fraction B. — Par chromatographie sur papier Whatman 3MM, solvant n° 2, après une migration de 17 heures, la révélation par la lumière ultra-violette, montre une tache migrant comme un témoin NAD. Son spectre d'absorption est caractéristique des nicotinamides adanine dinucléotides. Par action du cyanure de potassium à pH = 11, on voit apparaître un maximum d'absorption à $\lambda = 327$ mμ.

Fraction C. — La fraction se comporte comme une substance pure lors de la chromatographie sur colonne. La chromatographie sur papier Whatman 3MM, solvant n° 1, migration 24 heures ne révèle qu'une tache migrant comme un témoin d'AMP pur. Le spectre d'absorption de la tache découpée et éluée, en milieu acide

et en milieu alcalin est caractéristique des dérivés adényliques. Le dosage du phosphore et celui du ribose donnent respectivement 0,92 atome et 1 2 mole pour une molécule de nucléotide.

La fraction C est constituée par l'AMP.

Fraction D. — Par chromatographie sur papier Whatman 3MM, solvant n° 2, durée de migration 17 heures, la fraction D migre comme un témoin NADP. Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet est caractéristique des dérivés nicotinamide adenine dinucléotides. Par action du cyanure de potassium à pH = 11, on voit apparaître un second maximum à la longueur d'onde de 320 mμ ; le NADP passe ainsi de la forme oxydée à la forme réduite.

Fraction E. — La fraction E apparaît en très faible quantité. La chromatographie sur papier sépare deux substances dont le spectre d'absorption dans l'ultraviolet et le Rf indiquent qu'il s'agit vraisemblablement du GMP et d'UMP.

Fraction F. — La fraction F est homogène. La chromatographie sur papier ne montre qu'une seule tache migrant comme un échantillon d'ADP. Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet en milieu acide et en milieu alcalin est caractéristique des dérivés adényliques. Les teneurs en phosphore et en ribose pour une molécule de nucléotide sont respectivement 2,17 atomes et 0,87 molécule. Cette fraction est donc constituée par de l'ADP.

Fraction G. — La fraction G possède un spectre d'absorption dans l'ultraviolet caractéristique des dérivés uridyliques. Son hydrolyse par l'acide chlorhydrique 0,02 N en tube scellé pendant 15 minutes, libère des substances réductrices. La chromatographie des oses libérés par hydrolyse, effectuée dans le solvant acétate d'éthyle - pyridine - eau (2 : 1 : 2 v/v) montre après révélation par le nitrate d'argent la présence de glucose et une très faible quantité de galactose.

Les nucléotides présents dans cette fraction UDPG sont donc l'uridine diphosphate glucose et l'uridine diphosphate galactose.

Fraction H. — La fraction H est constituée principalement par du GDP. Celui-ci est identifié grâce à son spectre d'absorption caractéristique des dérivés guanyliques et son comportement chromatographique sur papier.

Fraction I. — La fraction I est constituée principalement par l'ATP. On note, en outre, la présence faible mais nette, sur le chromatogramme, d'UDP.

La spectrophotométrie dans l'ultraviolet déterminée à différents pH confirme leur identité.

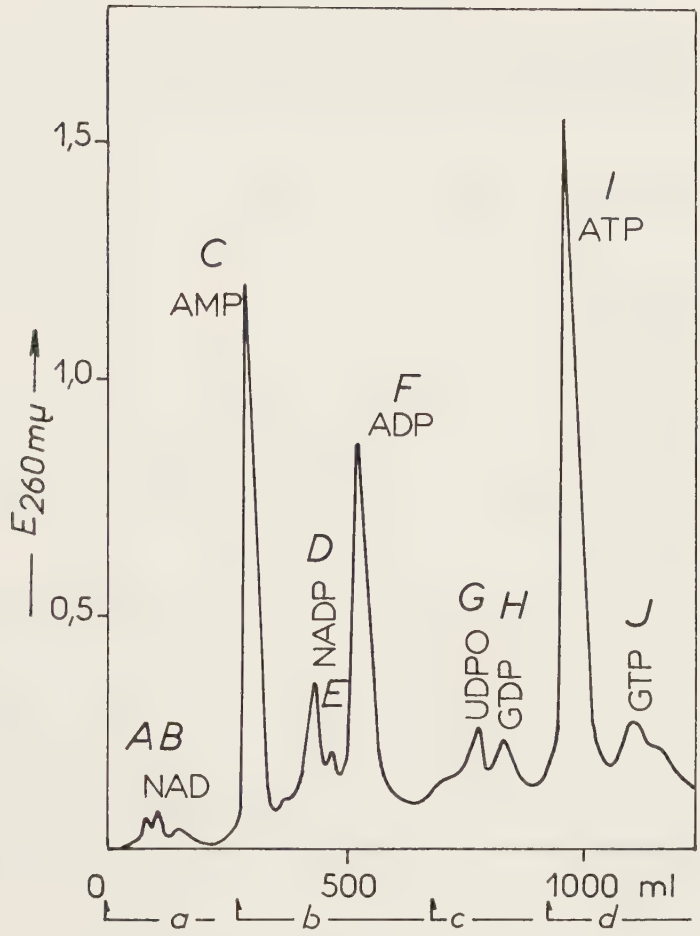


Fig. 2. — Répartition des nucléotides des hématies chez le Rat sain (Légende page 37, fig. 3).

Fraction J. — La chromatographie sur papier révèle la présence du GTP. Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet est caractéristique des dérivés guanyliques.

Etude quantitative

Les teneurs de différents nucléotides contenus dans les hématies de Rat sont exprimées en micromoles de nucléotides pour 100 ml de sang total. Elles sont groupées dans le Tableau I dans lequel nous rapportons également, à titre de comparaison, les taux de nucléotides déterminés dans les hématies humaines.

TABLEAU I

Répartition des nucléotides libres dans les hématies du Rat. Comparaison avec les nucléotides des hématies humaines. Résultats exprimés en micromoles pour 100 ml de sang.

Nucléotides	Hématies de Rat	Hématies humaines
NAD	0,7	1,5
NADP	4,6	3,1
AMP	9,7	3,8
ADP	12,6	3,5
ATP	20,3	34,0
ATP/ADP	1,61	4,1
CMP	1,05	—
GMP	traces	—
GDP	2,3	2,0
GTP	4,3	3,6
UDPO	2,3	3,5

Discussion

Nous avons mis en évidence dans les hématies de Rat la présence de tous les nucléotides libres signalés dans les hématies humaines (Chambon, 6, Vovan, 31). En effet, à côté des dérivés adényliques (AMP, ADP et ATP) classiquement connus, nous avons identifié le NAD et le NADP, les dérivés guanyliques (GDP, GTP et vraisemblablement GMP), le CMP et deux nucléotides conjugués : l'UDP-G et l'UDP-Gal).

Notons que le nucléotidogramme des hématies, que celles-ci appartiennent au Rat ou à l'Homme, est beaucoup moins complexe que celui relatif aux autres cellules ou tissus animaux. Les fractions isolées lors de la chromatographie initiale sont de ce fait, en général, homogènes.

Sur le *plan quantitatif*, nous avons noté la prédominance des nucléotides adényliques qui représentent plus de 60 p. 100 de la totalité des nucléotides.

Comparés aux taux des nucléotides des hématies humaines, ceux des nucléotides des hématies de Rat présentent des différences sensibles. En effet, la teneur en NAD est, chez le Rat, réduite de moitié tandis que celle du NADP augmente légèrement. On constate, en outre, une nette diminution d'ATP dans les hématies de Rat et surtout un abaissement important du rapport ATP/ADP. Ce phénomène semble indiquer une activité du métabolisme énergétique moindre dans les hématies de Rat par rapport aux globules rouges humains.

CHAPITRE TROISIEME

EFFETS DE LA PHENYLHYDRAZINE SUR LA REPARTITION DES NUCLEOTIDES LIBRES DES HEMATIES DE RAT

Notre expérience a porté sur un lot homogène de six rats de notre élevage et d'une même portée. Ces rats de souche Wistar pèsent entre 200 g et 240 g. Ils reçoivent une alimentation synthétique normale (aliments U.A.R.). L'administration du chlorhydrate de phénylhydrazine se fait par voie intrapéritonéale à la dose de 30 mg/kg, le premier et le cinquième jours de l'expérience.

Avant l'injection du toxique, nous avons déterminé l'hémogramme chez tous les animaux. Nous avons suivi l'anémie instaurée par la numération des globules rouges et des globules blancs et par la détermination du pourcentage de réticulocytes dans le sang circulant.

Au bout de dix jours, lorsque l'anémie est bien installée et que le nombre de réticulocytes dans le sang atteint 90 p. 100, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Le sang et la rate sont recueillis et traités en vue de l'extraction des nucléotides selon le protocole décrit dans le premier chapitre.

Deux séries d'expérience ont été effectuées. Les résultats de ces deux séries sont parfaitement concordants. Nous rapportons les données obtenues à l'issue d'un des deux essais.

Résultats

Notons tout d'abord que les animaux conservent leur comportement normal. Ils n'ont pas maigri et conservent leur habituel appétit.

Nous rapportons dans le Tableau II les données de l'hémogramme.

TABLEAU II

Variations de l'hémogramme au cours de l'intoxication des rats par la phénylhydrazine. Moyenne sur 6 rats.

Jours	Traitement	Hématies n. 10/mm3	Hémoglobine G/100 ml	Réticulocytes p. 100
0		6,30	13,9	1
1	Phénylhydrazine			
4		5,60	12,2	7
5	Phénylhydrazine			
10		4,30	10,1	90

Ces résultats montrent une diminution assez importante du nombre de globules rouges après l'administration de la phénylhydrazine (— 32 p. 100). La diminution du taux d'hémoglobine est inférieure à celle des hématies (— 20 p. 100). Il s'agit donc d'une anémie hyperchrome, ce qui confirme les données de Meyer (22). La caractéristique de l'anémie déclanchée par ce toxique est l'apparition dans le sang circulant d'un taux extrêmement élevé de réticulocytes (90 p. 100).

Nous avons noté, en outre, une *importante splénomégalie* puisque le poids de la rate passe de la rate passe de 0,170 g/100 g de Rat à 0,267 g. Les autres organes sont macroscopiquement normaux.

1 — *Nucléotides érythrocytaires.* — L'analyse des nucléotides libres par chromatographie sur résine échangeuses d'anions donne des résultats rapportés sur la figure n° 3 et dans le Tableau n° III

Sur la figure n° 3 nous représentons le diagramme d'élution relatif à la séparation des nucléotides des hématies.

TABLEAU III

Répartition des nucléotides libres dans les hématies de Rat anémié par la phénylhydrazine et dans les hématies de Rat sain. Résultats exprimés en micromoles pour 100 ml de sang

Nucléotides	Rat anémié	Rat normal	Variations
NAD	3,6	0,7	très augmenté
NADP	1,5	4,6	très diminué
AMP	2,0	9,7	très diminué
ADP	3,7	12,6	très diminué
ATP	15,4	20,3	diminué
ATP/ADP	*4,21*	*1,61*	très augmenté
CMP	1,1	1,05	inchangé
GMP	—	traces	
GDP	1,3	2,3	diminué
GTP	4,1	4,3	inchangé
UDPO	3,7	2,3	diminué

Du point de vue *qualitatif* nous avons retrouvé toutes les fractions nucléotidiques présentes dans les hématies de Rat sain exception faite pour le GMP et l'UMP qui apparaissent dans des proportions trop faibles pour être analysés d'une manière valable.

Du point de vue *quantitatif*, le Tableau III consigne les teneurs en nucléotides des hématies de Rat intoxiqué par la phénylhydrazine et celles relevées chez les animaux sains.

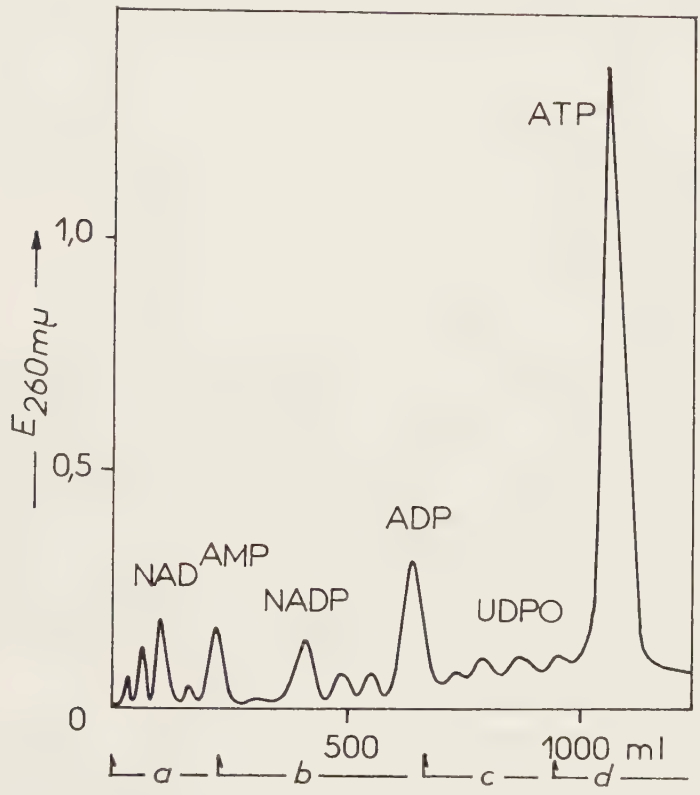


Fig. 3. — Chromatographie sur Dowez 1X8 (formiate) des nucléotides des hématies de Rat traité par la phénylhydrazine.

Colonne 0,8×18 cm. Ballon mélangeur = 500 ml initialement rempli d'eau distillée et alimenté successivement par :

a : acide formique 0,5N
b : acide formique 4N
c : acide formique 4N, Formiate d'Am 0,2M
d : acide formique 4N, Formiate d'AM 0,8M

En ordonnées : densité optique à λ = 260 m_μ
En abscisses : volume d'éluat

Ce tableau nous montre les principales variations des nucléotides. Il est remarquable de constater l'augmentation du rapport ATP/ADP (4,21), montrant ainsi une intensification de l'activité du métabolisme énergétique.

Si l'on excepte le NAD qui augmente d'une manière considérable (son taux passe de 0,7 micromole pour 100 ml de sang à 3,6 micromoles) tous les autres nucléotides restent inchangés ou accusent une régression sensible par rapport aux nucléotides des hématies des animaux sains.

2. — *Nucléotides spléniques.* — Afin de faciliter la tentative d'interprétation de nos résultats, nous avons procédé à l'analyse des nucléotides libres de la rate. Nous représentons à la figure n° 4 les nucléotidogrammes correspondant respectivement à la rate des animaux anémiés par la phénylhydrazine et celle des animaux sains.

L'examen du profil des nucléotides spléniques fait ressortir une similitude avec celui des nucléotides érythrocytaires. L'analyse des fractions obtenues après chromatographie sur résine échangeuse d'anions donne des résultats suivants :

Onze fractions désignées par des lettres allant de A à M ont été isolées. Elles sont dans l'ensemble assez homogènes.

Fraction A. — La fraction A possède un spectre d'absorption caractéristique des dérivés de la cytidine (maximum d'absorption en milieu acide à λ = 280 mμ). Après hydrolyse acide et chromatographie sur papier Whatman n° 1, solvant butanol-acétique, la révélation des taches par le réactif de DRAGENDORF montre la présence de la choline. La fraction A renferme vraisemblablement de la cytidine diphosphate-choline (CDP-Ch) ; cette substance étant déjà identifiée dans d'autres tissus animaux.

Fraction I. — La fraction I renferme deux substances séparées par chromatographie sur papier Whatman 3 MM. Leur spectre d'absorption est caractéristique des dérivés de l'uridine.

Après hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 0.02 N et chromatographie des oses dans le solvant pyridine-acétate d'éthyl-eau la révélation des taches par le réactif de MORGAN et ELSON (24) montre la présence de la glucosamine et de la galactosamine. Compte tenu des études analytiques effectuées par GREGOIRI (14) on peut conclure à la présence dans cette fraction désignée par l'abréviation UDPAH, de l'uridine diphosphate N-acétyl-glucosamine et de l'uridine diphosphate N-acétyl galactosamine (respectivement UDP-AG et UDP-AGal).

Fraction J. — La fraction J désignés par l'abrévation UDPO possède un spectre d'absorption dans l'ultraviolet, caractéristique des dérivés de l'uridine. Son hydrolyse par l'acide chrolhydrique 0,02 N suivie de la chromatographie des oses dans le solvant pyridine-acétate d'éthyle-eau et révélation par le nitrate d'argent, montre la présence de deux oses : le glucose et le xylose.

La fraction J renferme donc de l'uridine diphosphate glucose (UDPG) et de l'uridine diphosphate xylose (UDF-Xyl).

Les autres fractions ont été identifiées selon leurs critères normaux : spectrophotométrie, chromatographie et analyse chimique. Les résultats sont rapportés dans le Tableau IV.

TABLEAU IV

Identification des nucléotides spléniques

Fraction	Nucléotides identifiés
A	CDP-Ch
B	CMP
C	non identifiée
D	acide urique ?
E	AMP
F	GMP
G	IMP - UMP
H	ADP
I	UDP-AG et UDP-AGal
J	UDPG et UDP-Xyl
K	GDP
L	ATP
M	GTP

Il est à noter que nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence des nicotinamides adenine dinucléotides (NAD et NADP).

Sur le plan quantitatif, nous rapportons dans le tableau V, les teneurs en différents nucléotides de la rate, chez le Rat anémié par la phénylhydrazine et chez l'animal sain.

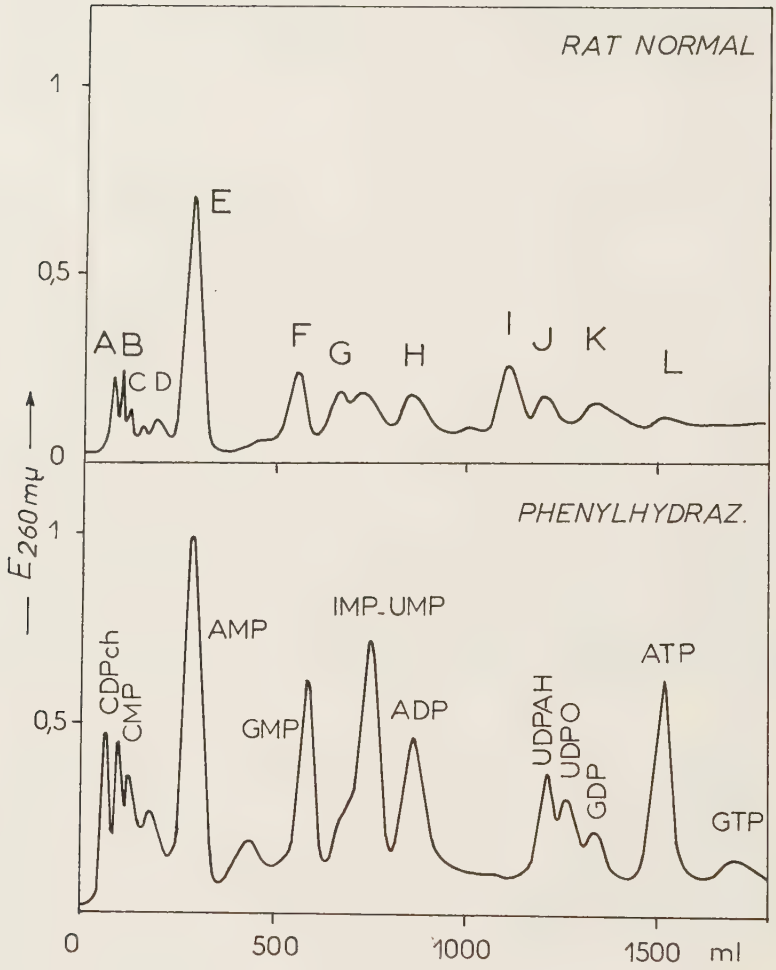


Fig. 4. — Répartition des nucléotides dans le tissu splénique

TABLEAU V

Répartition des nucléotides spléniques chez le Rat anémié par la phénylhydrazine et chez le Rat sain. Résultats exprimés en micromoles de nucléotides pour 100 g de rate fraîche.

Nucléotides	Rat anémié	Rat sain
AMP	53,5	70,0
ADP	27,3	12,9
ATP	*33,6*	7,2
ATP/ADP	*1,23*	0,56
UMP	27,5	14,8
UDPAH	26,8	18,1
UDPO	19,8	16,2
GMP	27,7	24,6
GDP	12,1	6,9
GTP	*3,95*	—
CMP	21,6	9,7
CDP - Ch	17,0	23,1
IMP	38,9	20,9

De l'examen de ce tableau, il ressort que sous l'influence de la phénylhydrazine, les teneurs des nucléosides triphosphates (GTP et ATP) de la rate augmentent nettement (respectivement 3,95 micromoles pour 100 g de rate fraîche, alors que chez les témoins, le GTP est quasiment inexistant et que le taux d'ATP est de 7,2 micromoles). On note par contre une diminution importante des nucléosides mono- et di-phosphates (AMP, ADP, UMP et GDP). Les autres nucléotides subissent peu de variations.

DISCUSSION

Dans l'anémie provoquée par l'introduction dans l'organisme de la phénylhydrazine, on note une décharge massive des éléments jeunes du système hématopoiétique, les réticulocytes.

Comme il s'agit de cellules hyperactives, nous avons trouvé un accroissement important du rapport ATP/ADP, indice d'une activité intense du métabolisme énergétique de la cellule. Notre donnée est identique à celle fournie par CHAMBON (6). Cette intensification du métabolisme énergétique doit être attribuée par conséquent aux propriétés des réticulocytes.

Mais la similitude des résultats entre CHAMBON et nous-mêmes s'arrête là. En effet, contrairement à ce qui a été décrit par cet auteur, nous n'avons pas observé, dans nos expériences, d'augmentation importante des nucléosides triphosphates dans les hématies de Rat traité par la phénylhydrazine. Bien au contraire, si l'on excepte le NAD, tous les autres nucléotides accusent une sen-

sible régression par rapport aux hématies saines, ou bien restent inchangés.

Il est probable que cette discordance est due à la différence de la sévérité de l'anémie obtenue par CHAMBON et par nous-mêmes ; les résultats étant exprimés par rapport au volume du sang total. On sait, par ailleurs, que le sang de Rat est hypercoagulable et malgré la présence de l'héparine, il est difficile de déterminer l'hématocrite ; les résultats obtenus ne sont qu'approximatifs.

L'analyse des nucléotides de la rate donne des résultats très intéressants et très significatifs. En effet, l'augmentation quasiment générale des nucléosides triphosphates et celle du rapport ATP/ADP montrent d'une manière indiscutable l'hyperactivité de la rate. Cet organe ne constitue pas, comme le voulait la vieille opinion, "un cimetière de globules rouges". Bien au contraire, lorsque l'organisme accuse une déplétion de globules rouges, la rate est sollicitée et par le fait de l'augmentation du taux de ses nucléotides, on peut dire qu'elle participe activement à la réparation hématopoïétique.

Ces observations se trouvent confirmées par une expérience au cours de laquelle nous avons tenté de réparer l'anémie provoquée par la phénylhdrazine en administrant aux animaux une médication martiale. En effet, nous avons traité un lot de six rats anémiés pendant deux semaines par un médicament à base de sulfate ferreux, à la dose de 105 mg de sulfate ferreux par jour, par voie orale. Au bout de ce temps nous avons noté chez les animaux traités un rétablissement beaucoup plus rapide du nombre de globules rouges et parallèlement une disparition plus accélérée des réticulocytes dans le sang circulant par rapport aux animaux anémiés et non traités.

L'analyse des nucléotides spléniques, dont les résultats sont rapportés sur la figure n° 5, montre que la nucléotidogramme tend à reprendre le profil de celui qui a été déterminé chez les animaux sains.

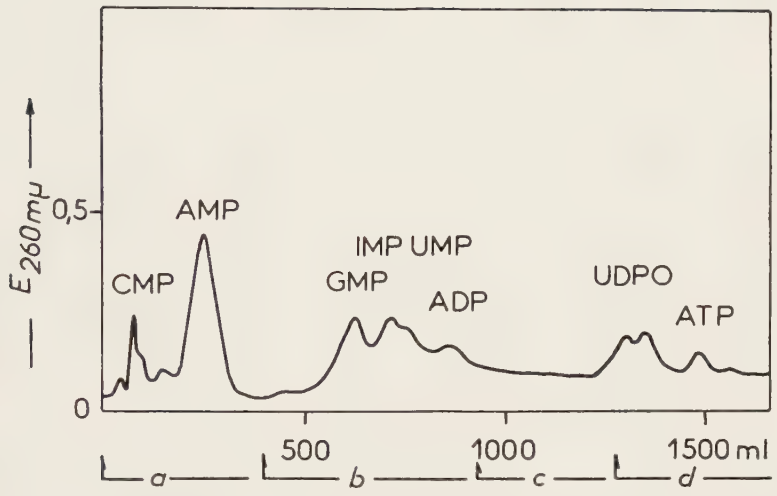


Fig. 5. — Chromatographie sur Dowez 1X8 des nucléotides spléniques de Rat anémié par la phénylhydrazine, puis traité par le sulfate ferreux.

Colonne 0,8 × 1,8 cm. Ballon mélangeur = 500 ml rempli initialement d'eau distillée et alimenté successivement par :

a : acide formique 0,5N
b : acide formique 4N
c : acide formique 4N, formiate d'Am 0,2M
d : acide formique 4N, formiate d'Am 0,8M

En abscisses: volume d'éluat recueilli par fractions de 5 ml
En ordonnées : densité optique déterminée à λ = 260 mμ

CHAPITRE QUATRIEME

EFFETS DE LA 6-MERCAPTOPURINE SUR LA REPARTITION DES NUCLEOTIDES LIBRES DES HEMATIES DE RAT

Nous avons utilisé pour cette expérience six rats dont le poids varie entre 180 et 200 g. Les animaux ont reçu une nourriture synthétique normale, composée de la manière suivante :

Caséine	140 g
Saccharose	300 g
Amidon	300 g
Huile d'arachide	50 g
Sel d'Osborne - Mandel	40 g
Vitamines	
Cellulose q. s. p.	1.000 g

Le traitement par la 6-mercaptopurine (Merck) se fait par voie orale tous les jours à la dose de 10 mg/kg/jour.

L'hémogramme a été déterminé avant le traitement, puis tous les 10 jours après le traitement.

L'expérience a duré 30 jours. Au bout de cette période, après avoir constaté que l'anémie s'est installée et que le nombre de leucocytes a considérablement diminué, nous sacrifions les animaux ; le sang et la rate ont été recueillis et analysés selon le protocole déjà décrit.

Résultats

Etat général. — Les animaux sont apparemment normaux. Ils conservent leur appétit et ne présentent aucun trouble visible. Leur poids corporel est augmenté en moyenne de 25 p. 100 ce qui est tout à fait normal.

L'examen des viscères montre qu'ils sont macroscopiquement normaux. On ne note qu'une légère splénomégalie puisque le poids de la rate est de 0,204 g pour 100 g de rat, alors que celui des animaux témoins est de 0,174 g.

Hémogramme. — Les nombres respectifs des globules rouges et des globules blancs relevés à différents stades de l'expérimentation sont indiqués dans le Tableau VI.

TABLEAU VI

Variations du nombre de globules rouges et celui des leucocytes au cours du traitement par la 6—mercaptopurine chez le Rat. Chiffres moyens pour 6 rats.

Jours	Globules rouges n. 10^6/mm3	Globules blancs n/mm3
Avant traitement	6,06	5.000
Après traitement		
10	5,10	3.400
30	5,15	1.800

On note, en outre, que le pourcentage des réticulocytes dans le sang circulant n'a pas subi de variation puisque ce pourcentage était inférieur à 1 pour 100 avant le traitement, reste dans cette limite à la fin de l'expérience

Ces résultats montrent que si la 6-mercaptopurine fait baisser le nombre de leucocytes, elle déclanche également, moins rapidement il est vrai, la diminution des globules rouges. Au bout de 30 jours de traitement, le nombre d'hématies diminue de moitié.

Nucléotides érythrocytaires

Nous représentons sur la figure n° 6 le diagramme d'élution relatif à la chromatographie des nucléotides des hématies de Rat traité par la 6-mercaptopurine.

Nous pouvons noter la présence des mêmes nucléotides identifiés chez le Rat sain, sauf celle du GTP.

Seuls leurs taux respectifs changent, comme en témoignent les résultats rapportés dans le Tableau VII.

TABLEAU VII

Répartition des nucléotides libres dans les hématies de Rat traité par la 6—mercaptopurine. Résultats exprimés en micromoles pour 100 ml de sang et comparés avec ceux déterminés chez le Rat sain.

Nucléotides	Rat traité par la 6—MP		Rat sain
	Rat adulte	Rat jeune*	
NAD	7,5	1,5	0,7
NADP	1,7	2,9	4,6
AMP	*13,5*	*17,0*	9,7
ADP	8,5	11,5	12,6
ATP	*7,8*	*6,3*	20,3
ATP/ADP	*0,91*	*0,54*	1,61
CMP	2,2	2,7	1,1
GMP	2,5	7,6	—
GDP	1,1	2,8	2,3
GTP	—	—	4,3
UDPO	4,7	2,0	2,2

* Un essai a été effectué sur des rats jeunes pesant entre 120 g. et 140 g.

De l'examen de ces résultats, il ressort que sous l'influence de la 6-mercaptopurine, les nucléotides libres des hématies régressent d'une manière notable. Cette diminution des taux de nucléotides érythrocytaires, et en particulier celui de l'ATP affecte plus les rats jeunes que les rats adultes.

Il est remarquable de constater que le rapport ATP/ADP diminue considérablement chez les rats traités (0,91 et 0,54 contre 1,61 aux témoins).

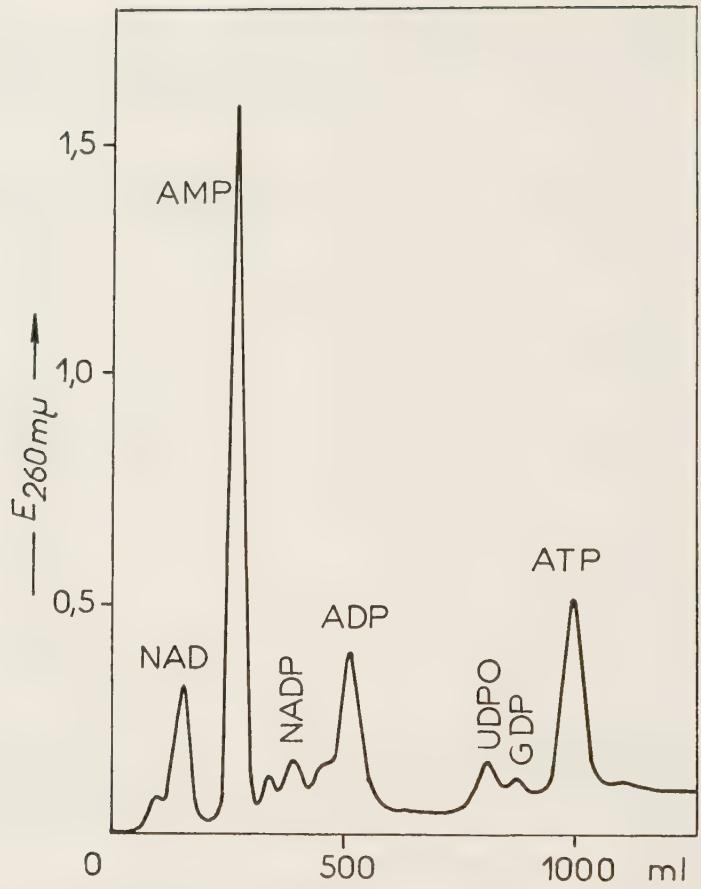


Fig. 6. — Répartition des nucléotides dans les hématies de Rat traité par la 6-mercaptopurine.

Nucléotides spléniques

Le diagramme concernant la chromatographie des nucléotides de la rate des animaux traités par la 6-mercaptopurine est représenté sur la figure n° 7.

Nous pouvons y noter l'absence de plusieurs nucléotides : l'UDPAH, les nucléotides guanyliques (GDP et GTP), la CDP-choline et l'IMP. L'UMP y est présent à l'état de traces.

On est donc frappé par la pauvreté de l'ensemble des nucléotides, sauf en ce qui concerne le CMP qui se trouve considérablement augmenté. Le taux de différents nucléotides rapportés dans le tableau VIII confirme bien cette impression.

TABLEAU VIII

Répartition des nucléotides libres dans la rate de Rat traité par la 6-mercaptopurine. Résultats exprimés en micromoles pour 100 g de rate fraîche.

Nucléotides	Rat traité par la 6-marcaptopurine	Rat sain
AMP	11,7	70
ADP	9,4	12,9
ATP	2,9	7,2
ATP/ADP	0,31	0,56
UMP	traces	14,8
UDPAH	—	16,1
UDPO	13,8	18,1
GMP	9,1	24,6
GDP	—	6,9
GTP	—	—
CMP	46,8	9,6
CDP-Ch	—	23,1
IMP	—	20,9

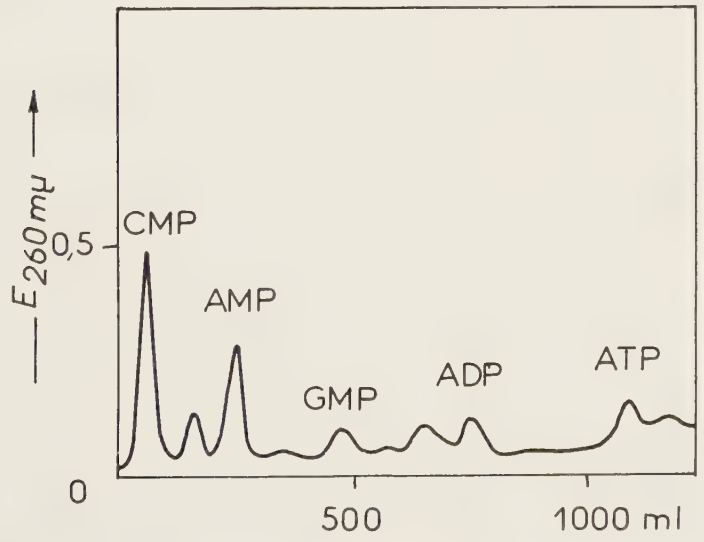


Fig. 7. — Répartition des nucléotides dans la rate de Rat traité par la 6-mercaptopurine.

Discussion

L'on s'est toujours posé la question de savoir si effectivement les antimétabolites ont une action plus marquée sur les cellules tumorales que sur les cellules saines. Plusieurs auteurs ont répondu affirmativement à cette question. Néanmoins on ne doit pas perdre de vue que ces substances sont aussi agressives pour les cellules saines. Nous en avons apporté la preuve. En effet, sur les animaux sains, l'administration de la 6-mercaptopurine détermine une déplétion des éléments figurés du sang, déplétion plus rapide pour les leucocytes que pour les hématies. Cet excellent anti-mitotique, dont l'emploi en thérapeutique antileucémique est désormais classique, semble inhiber les réactions métaboliques conduisant à la synthèse des éléments hématopoïétiques. L'argument favorable à cette hypothèse est apporté par les nucléotidogrammes des hématies et de la rate. Nous avons noté, en effet, une diminution générale et importante des nucléotides aussi bien érythrocytaires que spléniques, témoignant d'un ralentissement ou d'une inhibition du métabolisme dans le sein de ces deux organes du système hématopoïétique.

Il serait intéressant de confronter nos résultats avec ceux qu'on pourrait obtenir de la même manière chez les animaux rendus expérimentalement leucémiques.

Notons, enfin, que les rats adultes semblent mieux résister à l'action de la 6-mercaptopurine que les rats jeunes.

CHAPITRE CINQUIEME

INFLUENCE DU CYCLOPHOSPHAMIDE (ENDOXAN) SUR LES NUCLEOTIDES DES HEMATIES DE RAT

Notre expérience porte sur un lot de six rats blancs, pesant entre 180 g et 220 g.

Les animaux ont reçu une alimentation synthétique normale (décrite dans le chapitre précédent).

L'administration du cyclophosphamide (ENDOXAN-ASTA) se fait par voie intramusculaire à la dose de 100 mg/kg/jour.

Avant le traitement et tous les jours qui suivent la première injection, nous contrôlons la numération globulaire.

Au bout de 3 jours, le nombre de globules blancs descend à un chiffre voisin de zéro (2 à 3 chez certains rats). Nous les avons alors sacrifiés. Le sang et la rate sont recueillis en vue de la détermination du nucléotidogramme.

Résultats

L'état général des animaux est bon. L'appétit est conservé. Le poids n'a pas varié.

La rate est hypotrophique (son poids est de 0,126 g pour 100 g de Rat ; celui de la rate des animaux témoins étant de 0,174 g/100 g de Rat).

Numération globulaire. — Dans le Tableau IX nous rapportons les nombres de globules blancs et rouges déterminés chez les animaux avant et après le traitement.

TABLEAU IX

Numération globulaire chez le Rat soumis au traitement par le cyclophosphamide. Moyenne sur 6 rats.

Jours	Globules rouges n.10^6/mm3	Globules blancs n/mm3
0	7,30	4.000
2	5,85	1.900
3	4,47	250

Le pourcentage de réticulocytes dans le sang circulant est inférieur à 1 p. 100.

Ces résultats montrent que l'administration d'Endoxan par voie intramusculaire déclanche rapidement une sévère leucopénie et une importante anémie.

Nucléotides intra-érythrocytaires. — Nous représentons sur la figure n° 8 le diagramme relatif à la chromatographie des nucléotides érythrocytaires. Toutes les fractions nucléotidiques relevées chez les Rats sains sont présentes dans ce nucléotidogramme, exception faite pour le GTP, tandis que le CMP s'y trouve à l'état de traces.

Les résultats quantitatifs concernant ces nucléotides sont consignés dans le Tableau X.

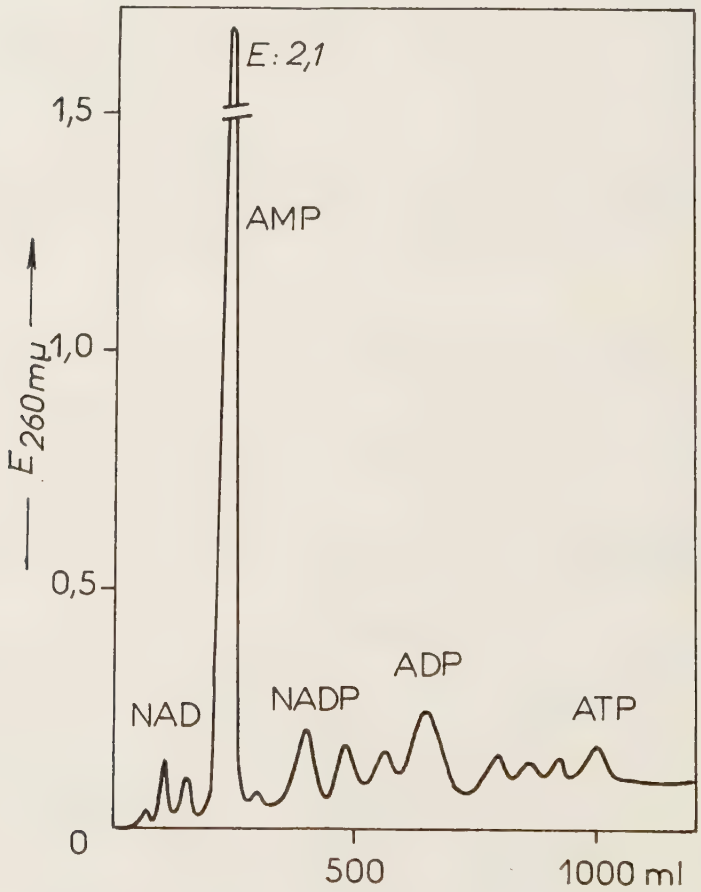


Fig. 8. — Répartition des nucléotides dans les hématies de Rat traité par le cyclophosphamide (Endoxan).

TABLEAU X

Repartition des nucléotides dans les hématies de Rat traité par le cyclophosphamide. Résultats exprimés en micromoles pour 100 ml de sang et comparés avec ceux obtenus chez le Rat sain.

Nucléotides	Rat traité par le cyclophosphamide	Rat sain
NAD	1,0	0,7
NADP	3,4	4,6
AMP	*26,3*	9,7
ADP	5,9	12,6
ATP	*2,3*	20,3
ATP/ADP	*0,39*	1,61
CMP	—	1,0
GMP	2,5	—
GDP	2,3	2,3
GTP	—	2,3
UDPO	2,4	4,3

On remarque une diminution importante de tous les nucléotides di- et tri-phosphates. Le taux d'ATP en particulier est réduit au dixième du taux normal tandis que le GTP a complètement disparu du nucléotidogramme. La régression moins importante de l'ADP fait baisser considérablement le rapport ATP/ADP (0,39). L'AMP, par contre, accuse une nette augmentation.

Ces phénomènes sont interprétés comme étant dus à une inhibition du métabolisme intra-érythrocytaire et à ce titre, l'activité du cyclophosphamide offre une analogie avec celle de la 6-mercaptopurine.

La pauvreté des nucléotides est encore plus marquée dans la rate comme en témoigne le chromatogramme des *nucléotides spléniques* représenté par la figure n° 9.

La diminution des nucléotides dans la rate est telle qu'on ne peut raisonnablement espérer une détermination quantitative correcte.

Nous donnons seulement les taux de quelques-uns des nucléotides :

AMP	= 10,8	micromoles/100 g de rate
CMP	= 36,2	—
UDPO	= 10,2	—
GMP	= 8,8	—
ATP	= 2,0	—
ADP	= 6,5	—

Ces résultats confirment les observations faites à propos de la 6-mercaptopurine, en ce sens que l'activité intra-splénique et l'activité intra-érythrocytaire sont ralenties chez le Rat ayant subi le traitement par les anti-tumoraux.

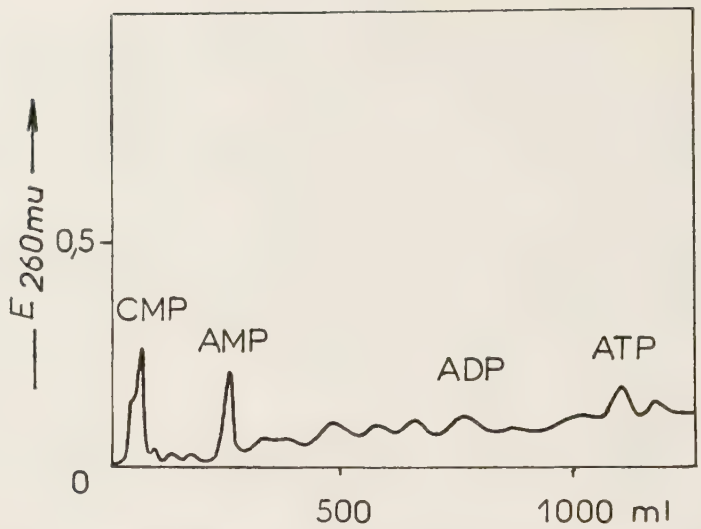


Fig. 9. — Répartition des nucléotides dans la rate de Rat traité par le cyclophosphamide (Endoxan).

Récapitulation des résultats

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus à l'issue de diverses expériences, nous regroupons dans les Tableaux XI et XII respectivement les taux des nucléotides érythrocytaires et ceux des nucléotides spléniques.

TABLEAU XI

Tableau récapitulatif des répartitions des nucléotides des hématies de rat (micromoles/100 ml de sang).

Nucléotides	Rat normal	Rat Phén.*	Rat 6-MP*	Rat Endoxan*
NAD	0,7	*3,6*	*7,5*	1,0
NADP	4,6	*1,5*	*1,7*	3,4
AMP	9,7	*2,0*	*13,5*	*26,3*
ADP	12,6	*3,7*	*8,5*	*5,9*
ATP	20,3	15,4	*7,6*	*2,3*
ATP/ADP	1,61	*4,2*	*0,91*	*0,39*
CMP	1,1	1,1	2,2	—
GMP	—	—	2,5	2,5
GDP	2,3	1,3	1,1	2,3
GTP	2,3	*4,1*	—	—
UDP-O	4,3	3,7	4,7	2,4

* Phén. : Phénylhydrazine
6-MP : 6-marcaptopurine
Endoxan : cyclophosphamide

** Les chiffres ayant subi des variations significatives sont en italique.

TABLEAU XII

Tableau récapitulatif des répartitions des nucléotides libres spléniques chez le Rat (micromoles 100 g de rate fraîche).

Nucléotides	Rat normal	Rat Phén.	Rat 6-MP	Rat Endoxan
AMP	70,0	53,5	11,7	10,8
ADP	12,9	27,3	9,4	6,5
ATP	7,2	33,6	2,9	2,0
ATP/ADP	0,56	1,23	0,31	0,30
UMP	14,8	27,5	traces	traces
UDPAH	18,1	26,8	—	—
UDP-O	16,2	19,8	13,8	10,2
GMP	24,6	27,7	9,1	8,8
GDP	6,9	12,1	—	—
GTP	—	3,9	—	—
CMP	9,7	21,6	46,8	36,5
CDP-Ch	23,1	17,0	—	—
IMP	20,9	38,9	—	traces

L'ensemble de ces résultats nous permet de tirer les conclusions suivantes :

CONCLUSIONS

Notre travail a été consacré à l'étude des nucléotides libres des hématies de Rat et leurs variations au cours de l'anémie provoquée par l'administration des substances érythrotoxiques telles que la phénylhydrazine et des antitumoraux couramment employés en thérapeutique humaine dans le traitement des hémopathies malignes et des carcinomes : la 6-mercaptopurine et le cyclophosphamide.

Nous avons analysé parallèlement les nucléotides libres d'un organe du système réticulo-endothélial : la rate.

Nucléotides des hématies de Rat sain. — Nous avons mis en évidence la présence de tous les nucléotides libres contenus dans les hématies humaines : l'adénosine mono-, di- et tri-phosphate (AMP, ADP et ATP), la guanosine mono-, di- et tri-phosphate (GMP, GDP, et GTP), la cytidine mono-phosphate (CMP), l'uridine diphosphate-ose (UDPO) et les nicotinamides adénine dinucléotides (NAD et NADP).

Sur le plan quantitatif, nous avons constaté que les hématies de Rat renferment moins de nucléotides que les hématies humaines. En particulier, le taux d'ATP, qui est de 20,3 micromoles pour 100 ml de sang chez le Rat est nettement inférieur à celui déterminé chez l'Homme (34 micromoles). Notons que parmi ces nucléotides, les dérivés de l'adénine prédominent nettement.

Ces résultats sont dans l'ensemble en accord avec ceux fournis par REMENCHIK et par CHAMBON. Nous avons trouvé, cependant, que le rapport ATP/ADP, indice fidèle de l'activité énergétique (1,6) est très inférieur au rapport noté dans les hématies humaines.

Nucléotides des hématies de Rat anémié par la phénylhydrazine. — Nous avons administré aux Rats adultes, le premier et le cinquième jour de l'expérience, 30 mg/kg de chlorhydrate de phénylhydrazine. Au bout de dix jours, nous avons noté une anémie sévère (le nombre moyen de globules rouges cesse de $6,3.10^6$/mm3 à $4.3.10^6$) avec réticulocytose importante (le pourcentage moyen de réticulocytes dans le sang circulant passe de 1 p. 100 à 93 p. 100).

Contrairement à ce qui a été décrit par CHAMBON et coll., nous n'avons pas noté d'augmentation notable des nucléotides triphosphates des hématies des animaux ainsi traités. Par contre l'élévation du rapport ATP/ADP que nous avons observé chez ces animaux montre une intensification du métabolisme énergétique intra-globulaire. Ceci est dû vraisemblablement à l'apparition dans le sang circulant d'un taux important de réticulocytes, cellules jeunes et hautement actives.

En confrontant ces résultats avec les valeurs des nucléotides spléniques, nous avons constaté une intéressante corrélation qui existe entre les hématies et la rate, deux des organes du système hématopoïétique. En effet, nous avons relevé une augmentation des taux de nucléotides spléniques chez les animaux témoins. Cette augmentation porte sur tous les nucléotides, mais d'une manière plus accusée, en ce qui concerne l'ATP.

Cette observation confirme bien que la rate joue un rôle actif dans la fonction hématopoïétique et ne constitue pas, comme on le pensait généralement, simplement "un cimetière de globules rouges".

Il est remarquable de noter par ailleurs, que sous l'influence d'un traitement martial, à base de sulfate ferreux en même temps que la régression du taux de réticulocytes dans le sang, la répartition des nucléotides spléniques tend à devenir normale.

Nucléotides des hématies de Rat traité par les antitumoraux. — Nous avons administré aux rats sains, deux antitumoraux : la 6-mercaptopurine (purinéthol) et le cyclophosphamide (endoxan), utilisés couramment en thérapeutique humaine dans le traitement des hémopathies malignes et des carcinomes.

La 6-mercaptopurine est administrée par voie orale à la dose de 10 mg/kg/jour pendant 30 jours. Nous avons assisté à une diminution progressive du nombre d'hématies et celle plus accentuée des leucocytes. En fin d'expérience, le nombre de globules rouges a diminué de moitié.

L'administration du cyclophosphamide a été faite par voie intramusculaire à la dose de 100 mg/kg/jour. Au bout de trois jours, nous avons constaté un "nettoyage" quasiment total des leucocytes tandis que le nombre de globules rouges a diminué de moitié Les animaux ont été alors sacrifiés et leur sang analysé.

Dans les deux cas, les nucléotides libres des hématies accusent une régression considérable portant sur les nucléotides à base purique et sur les nucléosides triphosphates. Ce phénomène est interprété comme étant la conséquence d'une inhibition de l'activité métabolique intra-érythrocytaire provoquée par les antitumoraux. La détermination des teneurs en nucléotides de la rate permet de noter une diminution importante de celles-ci, offrant ainsi à nouveau l'image d'une corrélation existant entre le métabolisme intra-érythrocytaire et le métabolisme intra-splénique.

En conclusion, l'analyse des nucléotides libres des hématies offre la possibilité d'un contrôle biochimique des conséquences d'une thérapeutique antitumorale. Cet examen pourrait constituer un moyen d'étude de la toxicité des médicaments touchant la fonction hématopoïétique. Il est, à notre sens, plus efficace que la simple détermination de la leucopénie. Celle-ci ne fournit, en effet, qu'un témoignage indirect de l'atteinte des cellules et des organes hématopoïétiques en permanente multiplication.

Résumé

1. — Nous avons étudié la répartition des nucléotides libres des hématies de Rat sain et nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux déterminés chez l'Homme.

2. — Nous avons étudié les variations de ces nucléotides au cours de l'intoxication par la phénylhydrazine et au cours du traitement par la 6-mercaptopurine et par le cyclophosphamide ; ces deux médicaments sont utilisés couramment dans le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs malignes.

3. — Nous avons proposé l'application de ce procédé au contrôle des atteintes des cellules des organes hématopoïétiques provoquées par les médications antitumorales.

Lu et approuvé

Le Président du Jury

Professeur J.C. DUMAZERT

VU

Marseille, le 10 décembre 1968

Pour le Doyen

L'Assesseur

Professeur Ch. GREBUS

BIBLIOGRAPHIE

1. BARLETT (G.R.). — J. Biol. Chem., 1959, *234 :* 449.
2. BAYLIN (G.). — Thèse Médecine Bordeaux, 1960, 59 pages.
3. BIRABEN (J.), DELMON (G.). — Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1963 *102 :* 119.
4. BREWER (G.J.), ARBOR (A.). — J. Clin. Invest., 1964, *43 :* 1287.
5. BRIGGS (A.P.). — J. Biol. Chem., 1922, *53 :* 13.
6. CHAMBON (P.), KARON (H.), MANDEL (P.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, *43 :* 127.
7. CHEVALLIER (A.), MANUEL (S.), CHATEAU (D.). — C.R. Soc. Biol., 1962, *156 :* 372.
8. DUBOIS-FERRIERE (H.), KALACI (S.), RUDHARDT (M.). — Méd. Hyg. (Genève), 1960, *18 :* 572.
9. ELION (G.B.), BALIS (M.E.). — Fed. Proc., 1955, *14 :* 207.
10. ELION (G.B.), HITCHING (G.H.). — In Ciba Foundation Symposium on the chemistry and biology of Purines. J. et A. Churchill. Ltd. London., 1957, p. 286.
11. ERDOS (J.). — Internat Z Vitaminforech 1952, *23 :* 494.
12. FRIEDKIN (M.). — Biochim. Biophys. Acta, 1955, *16 :* 447.
13. GAJDOS (A.). — Sang, 1949, *19,* 683.
14. GREGOIRE (J.), LIMOZIN (N.), GREGOIRE (J.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, *44* : 765.
15. HEIMEYER (L.). — Rev. Hémat., 1954, *9* : 267.
16. HURLBERT (R.B.), SCHMITZ (H.), BRUMM (A.F.), POTTER (V.R.). — J. Biol. Chem., 1954, *209* : 29.
17. JACOB (H.S.), JANDL (J.H.). — J. Clin. Invest., 1964, *43 :* 1704
18. KORITZ (S.B.), CHANTRENNE (H.), Biochem, Biophys. Acta, 1954, *13 :* 209.
19. LELONG (M.), FLEURY, ALAGILLE (D.), MALASENET (R.), LORTHOLARY (P.) et PARA (M.). — N.R. Franc. Hemat., 1961, *1 :* 819.

20. MANDEL (P.), CHAMBON (P.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, *41* : 989.

21. MEJBAUM (W.). — Z. physiol. Chem. Hoppe-Seylar's, 1939, *258* : 117.

22. MEYER (E.). — Thérapie, 1957, *12* : 105.

23. MOHLER (D.N.), EBY (N.). — Clin. Res., 1964, *12* : 217.

24. MORGAN (W.J.T.), NELSON (J.A.). — Biochem. J., 1934, *28*, 988.

25. PARTRIDGE (S.M.). — Nature, 1949, *164* : 443.

26. PRANKERD (T.A.J.). — The Red Coll. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1961, 184 pages.

27. PRANKERD (T.A.J.), ALTMAN (K.I.). — Biochem. J., 1954, *58* : 622.

28. REMENCHIK (A.P.), HOOVER (C.R.), BRYNJOLFSSON (G.). — Clin. Chim. Acta, 1968, *19* : 227.

29. SKIPPER (H.E.). — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1954, *60* : 315.

30. SMITH (I.). — Chromatography and electrophoratic techniques. William Heinheman. Medical Books, LTS - London - Vol. 1, p. 252.

31. VOVAN (L.). — Thèse Doct. Méd., Marseille 1968, polycop. 98 pages.

32. VOVAN (L.), PERRIMOND (H.), ORSINI (A.), Marseille Médical, 1968, *105* : 1.

33. ZURCHER (C.), LODS (J.A.), PRINS (H.K.). — X^{me} Cong. inter. Soc. Hasmet. Stockholm, 1964.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 13

Nucléotides libres des hématies 13
La phénylhydrazine 15
La 6-mercaptopurine 16
Le cyclophosphamide 18

PLAN DE TRAVAIL 23

RECHERCHES PERSONNELLES 25

CHAPITRE I. — *MATERIEL D'ETUDE ET TECHNIQUES* .. 25

CHAPITRE II. — *NUCLEOTIDES LIBRES DES HEMATIES DE RAT SAIN* 31
Etude qualitative 31
Etude quantitative 33
Discussion 34

CHAPITRE III. — *EFFETS DE LA PHENYLHYDRAZINE SUR LES NUCLEOTIDES DES HEMATIES DE RAT* 35
Nucléotides érythrocytaires 36
Nucléotides spléniques 38
Discussion 41

CHAPITRE IV. — *EFFETS DE LA 6-MERCAPTOPURINE SUR LES NUCLEOTIDES DES HEMATIES DE RAT* 45
Nucléotides érythrocytaires 46
Nucléotides spléniques 48
Discussion 50

CHAPITRE V. — *EFFETS DU CYCLOPHOSPHAMIDE SUR LES NUCLEOTIDES DES HEMATIES DE RAT* 51
Récapitulation des résultats 54

CONCLUSION 57

BIBLIOGRAPHIE 61

TABLE DES MATIERES 63